

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭63-24951

⑮ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)2月2日

A 61 L 25/00

A-6779-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 一成分組織接着剤およびその製造方法

⑯ 特 願 昭62-165587

⑰ 出 願 昭62(1987)7月3日

優先権主張 ⑱ 1986年7月5日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P3622642.4

⑲ 発 明 者 ノルベルト・ハイムブルグ  
ドイツ連邦共和国デー3550マルブルク、ゾネンハンク10

⑲ 発 明 者 ベーター・フーゲ  
ドイツ連邦共和国デー3551ランタール、アム・ファイ  
ゼルベルク2

⑲ 発 明 者 ハンスイエルク・ロネ  
ベルグ  
ドイツ連邦共和国デー3550マルブルク、バベルグエーク  
22

⑲ 出 願 人 ベーリングヴェルケ・  
アクチエンゲゼルシャ  
フト  
ドイツ連邦共和国マルブルク/ラーン(番地なし)

⑲ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

明 細 書

1. 発明の名称 一成分組織接着剤およびその  
製造方法

2. 特許請求の範囲

1) 水性溶液中にフィブリノゲンFⅡ、トロン  
ビン阻害剤、プロトロンビン因子およびカル  
シウムイオン、そして適切な場合にはプラス  
ミン阻害剤を含む組織接着剤。

2) 固体状の特許請求の範囲第1項記載の組織  
接着剤。

3) 含まれるすべての活性物質が低温殺菌され  
る特許請求の範囲第1項記載の組織接着剤。

4) 溶液中に70〜90mg/ℓのフィブリノゲ  
ン、10〜30U/ℓ(FⅡに基づく)のプロ  
トロンビン因子、0.5〜1ミリモル/ℓのカル  
シウムイオンおよび0.1〜1IU/ℓのATⅢを  
含む特許請求の範囲第1項記載の組織接着  
剤。

5) プラスミン阻害剤としてアプロチニンまた  
はα<sub>2</sub>-抗プラスミンを含む特許請求の範囲  
第1項記載の組織接着剤。

6) トロンビン阻害剤として抗トロンビンⅢ、  
ヒルジンまたはヘパリンを含む特許請求の範  
囲第1項記載の組織接着剤。

7) 溶液1ℓ中に、

65〜115mgのヒト・フィブリノゲン、

40〜80Uの第Ⅱ因子、

1〜50IUのPPSB(プロトロンビン因子)(F

Ⅱ(プロトロンビン)に基づく)、

0.01〜50IUの抗トロンビンⅢ、

0.1〜5ミリモル/ℓのカルシウムイオン、

そして適切な場合には

1〜10,000KIUのアプロチニン

を含む特許請求の範囲第1項記載の組織接着  
剤。

8) 7.5のpHを有し、適切な場合には低温殺菌

済みであり、そして適切な場合には経過により滅菌済みであり、そして少なくとも16g/lのヒト・フィブリノゲン、フィブリノゲン1モルあたり2グラム原子のカルシウムおよび1~6g/lのL-アルギニンモノ塩酸塩を含む水性等張溶液に、ヒト・第Ⅲ因子の、ヒト・アルブミンの、プロトロンビン濃縮物の、抗トロンビンⅢのおよびアプロチニンの、適切な場合には低温殺菌済みの溶液、および適切な場合にはグルタミン酸ナトリウムおよびイソロイシンを凍結乾燥された溶液が容器に分注された容量の1/4中に再構成した後、これらの物質を以下の濃度範囲、すなわち、

65~115mg/lのヒト・フィブリノゲン、

40~80U/lの第Ⅲ因子、

4~40mg/lのヒト・アルブミン、

1~50IU/lのPPSB(プロトロンビン因子)

(FⅡ(プロトロンビン)に基づく)、

伴う生理学的過程の結果として傷害部の領域にフィブリンが沈着する。これは傷害を受けた細胞から流出するトロンボプラスチンにより、そして血漿第Ⅶ因子形成第Ⅹ因子活性化(これは次いで第Ⅴ因子と共に、そして磷脂質およびカルシウムとの複合体としてプロトロンビンをトロンビンに変える)に接触すると開始される。更にトロンビンの作用により、フィブリノゲンからのフィブリノペプチドAおよびBの除去を経てフィブリンモノマーが生じそれらが凝集して共有結合的に架橋したフィブリンフィラメントを形成する(同様にトロンビンにより活性化されるトランスグルタミナーゼである第Ⅲa因子によるイソペプチド結合の形成を伴う)。阻害剤、すなわちα<sub>2</sub>-抗プラスミンは第Ⅲ因子によりフィブリンフィラメントに結合されそしてそれらをプラスミンによる分解から防護する。

0.01~50IU/lの抗トロンビンⅢ、

および適切な場合には

1~10,000KIUアプロチニン/l、および

0~20g/lのグルタミン酸ナトリウムおよび

び

0~20g/lのイソロイシン

を含むように添加することよりなる、特許請求の範囲第1項記載の組織接着剤の製造方法。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明はフィブリノゲン、第Ⅲ因子(FⅢ)、トロンビン阻害剤、プロトロンビン因子、カルシウムイオンおよび適切な場合にはプラスミン阻害剤を含む組織接着剤に関する。結合されるべき傷に自然に存在する促進剤は、接着に必要なトロンビンを接着剤中のプロトロンビンから遊離させる。

人間または動物組織における病変部の修復に

この止血および傷の治療の過程から基質としてのフィブリノゲンの外に2種類の酵素すなわちトロンビンと第Ⅲ因子が必要であることは明白である。

この関連でのトロンビンの役目はフィブリノゲンおよび第Ⅲの両者を活性化する、すなわちそれらを反応性の形に変えることにある。これはフィブリノゲンについてはフィブリンモノマーであり、そして第Ⅲ因子については触媒的に活性なトランスグルタミナーゼ(第Ⅲa因子)である。

欧州特許第0,068,047号は、傷害部閉鎖剤として適し、そしてフィブリノゲン、フィブリン溶解阻害剤およびトロンビンまたはプロトロンビンを無水系中に含む富化血漿成分を開示している。この接着剤は水に溶解した状態で適用することはできず、粉末としてしか適用できないという使用上の欠点がある。その混合物を水に

溶解すると成分同士が反応して血餅が生じる。

水を溶媒とする一成分接着剤については、接着剤の製造、溶媒による再構成、および使用時状態保持の間に媒の熱していない望ましくない活性化が起こらずにしかも一方で接着部位に適用後比較的迅速に十分高い強度が得られるような方法で、またそのような量比で活性物質を組み合わせることは困難である。

驚くべきことに、實際上、生理学的媒質中で操作することのできる一成分接着剤の再現性ある製造を可能にする条件が見出された。

このタイプの一成分接着剤を製造し、そして処理しやすいものとするための要件は、フィブリノゲン、プラスミン阻害剤、FⅢ、プロトロンビン濃縮物、トロンビン阻害剤およびカルシウムイオンの相対濃度を至適化することである。カルシウムイオンは凝固因子の活性化に不可欠であることから、このことは特にトロンビン阻

カルシウムイオンの規定濃度の設定が含まれる。

従って、本発明は水性溶液中にフィブリノゲン、第Ⅲ因子、トロンビン阻害剤、プロトロンビン因子、カルシウムイオンおよび適切な場合にはプラスミン阻害剤を含む組織接着剤に関する。

いわゆる過凝固性(hypercoagulable)溶液としてのプロトロンビン(該溶液は更にカルシウムイオンおよびATⅢをも含有する)と共にフィブリノゲンをパツクし、そして組織接着剤として用いることができることは驚くべきことであった。

この本発明のタイプの接着剤は、固体剤型に変える、例えば凍結乾燥し、そして水で再構成することができる。それらはすべての活性物質を低温凝固された形で含むことができ、またそうすれば肝炎および HTLV Ⅲ の伝染の危険が無

害剤としてのATⅢおよびカルシウムイオンにあるはまる。高濃度はトロンビン形成速度を高め、そして低濃度はそれを低める。従って、カルシウムイオン濃度が至適であることが必要である。そうだとすれば、トロンビン形成は排除できないことからトロンビン阻害剤、好ましくはATⅢと組み合わせるのが得策である。これは一方で接着剤製造の際にトロンビン形成が排除されねばならないこと、そして他方では凝固、すなわちフィブリンフィルムの沈着が傷害部表面との接触の際に開始するときその接着が安定な血餅を迅速に形成しなければならないことによるものである。それ故に、トロンビン含有一成分接着剤の製造、およびその水性溶液中での使用は考えられないことであり、更に製造中および使用準備中にトロンビンへの活性化を妨げる条件下においてのみプロトロンビンの使用が可能である。これらにはトロンビン阻害剤および

くなる。

活性物質のフィブリノゲン、プラスミン阻害剤、第Ⅲ因子、カルシウムイオンおよびATⅢの混合比は、時機尚早の活性化が起きることがなく、しかも傷害部との接触時にその混合物が自発的に凝固しそしてフィブリンを沈着するような比である。

これが起こるのに要する時間は臨床上の要件に合致する。本発明の一成分接着剤はその作用においては従来技術の二成分系と異ならない。

この接着剤中の活性物質混合物は、使用溶液中にあって、フィブリノゲン濃度が70~90 mg/mlであり、そしてプロトロンビン因子濃度がFⅢに基づき10~30 U/mlであるようなものである。一部が接着剤中でタンパク結合しているカルシウムイオンの濃度は、使用溶液中、0.5~1ミリモル/lとなるようにする。トロン

ビン阻害剤の例はATⅢ、ヒルジンおよびヘパリンであり、そしてATⅢは好ましくは0.1~1 U/μl (組織接着剤) の濃度で用いられるが、この濃度においてそれはプロトロンビン因子とカルシウムイオンが前述の濃度のとき、時機尚早のフィブリン形成を防止する。しかしながら他方において、後者を促すことも(このことが指示に基づき望ましいと思われるときには)可能である。このためには、凍結乾燥接着剤を0.5~1 ミリモル/l 以上のカルシウムイオン最終濃度となるよう溶解することができる。しかしながら、その場合には再構成後速やかに用いることが必要である。

接着剤を製造するには、可及的に高い活性を有し、そして適切な場合には低温殺菌した可溶性の形の活性物質をまず製造する。フィブリノゲン濃度はなるべく高くすべきである。何故ならば接着強度は濃度が高い程大きいからで

る阻害剤をも含有する。この阻害剤は結合のために選択されたフィブリノゲンの随伴物質の形であってもよいが、好ましくはアプロチニンの形で接着剤に添加するのが好ましい。凍結乾燥後の組織接着剤再構成を向上させるために、その組織接着剤にアルブミンおよび/または尿素および/またはグアニジン残基を含有するほか、適切な場合には疎水性側鎖を有するアミノ酸または水溶性脂肪酸、そして更にヘパリンをも含む物質を含ませることもできる。

組織接着剤の調製に適しかつ好ましいフィブリノゲンは精製され、そして既に第Ⅱ因子を含有する。しかしながらこれとは別に(経験的に分かっていることであるが)第Ⅱ因子に加えてα<sub>2</sub>-抗プラスミンおよびヒト・アルブミンを含有する低温沈降(cryoprecipitate)も適している。しかしながら個々の成分、すなわちヒト・フィブリノゲン、第Ⅱ因子(血漿または胎

ある。フィブリノゲンは例えば、欧州特許第0.103.196号の記載の如くに製造し低温殺菌することができ、また欧州特許第0.085.923号の記載の如くに尿素またはグアニジン残基を含むタイプの化合物の添加剤により所望の溶解度を付与することができる。第Ⅲ因子は欧州特許第0.018.561号の記載の如くに低温殺菌することができ、またプロトロンビン因子は欧州特許第0.056.629号の記載の如くに低温殺菌することができる。

本発明の好ましい接着剤における活性物質は原則的にヒト・フィブリノゲンを可及的高濃度に含み、第Ⅱ因子およびプロトロンビン複合体の因子(第Ⅱ、Ⅵ、ⅨおよびⅩ因子)、カルシウムイオンおよび抗トロンビンⅢで富化されている。組織接着剤はまたプラスミノゲン活性化剤および/またはプラスミンを阻害し、従って生成フィブリンをプラスミンによる分解から守

整からのもの)、プラスミン阻害剤、プロトロンビン因子(第Ⅱ、Ⅵ、ⅨおよびⅩ因子)、アルブミン、ATⅢおよびカルシウムイオン、尿素残基またはグアニジン残基を有する化合物、または疎水性側鎖を有するアミノ酸または水溶性脂肪酸を混合することによっても同等の作用を有する接着剤を製造することもできる。

接着剤のための活性化合物混合物は固体、好ましくは凍結乾燥物の形態にあるのが有利である。

組織接着剤は好ましくは使用溶液1 μlあたり次の量の(適切な場合には低温殺菌された)活性化合物を含有する。

65~115、好ましくは70~90 μgの高度精製ヒト・フィブリノゲン、

40~80 Uの第Ⅱ因子、

1~50、好ましくは10~30 IUのPPSB(プロトロンビン因子)(FⅡ(プロトロンビン))に基づ

く)、

0~10,000 KIUのアプロチニン、

0.01~50、好ましくは0.1~1IUの抗トロン  
ビンⅢ、

0~5 USP Uのヘパリン、および

0.1~5、好ましくは0.5~1ミリモル/ℓの  
カルシウムイオン(好ましくは塩化カルシウム  
として)。

接着剤は安定化剤および可溶化剤として、例  
えばグルタメート、レ-イソロイシン、レ-ア  
ルギニンまたはヒト・アルブミンを含有するこ  
とができる。

組織接着剤の固体活性化化合物の混合物は、水  
またはカルシウムイオン含有溶媒に20℃で短  
時間に溶解することができる。一体化または結  
合されるべき組織に適用されると、その接着剤  
は第二成分としてトロンビンを必要とするこ  
となく、十分短い時間内に高い結合力を発現

そして欧州特許第0,103,196号に記載の方法で  
得た580gの低温殺菌され高度に精製された  
ヒト・フィブリノゲンを下記の組成を有する  
580mlの緩衝液、pH 7.5(透析緩衝液)に溶解  
した:

0.05モル/ℓ NaCl

0.005モル/ℓ クエン酸三ナトリウム

0.3g/100ml レ-アルギニン

このようにして得られたフィブリノゲン溶液  
を4℃で16時間ずつ2回および8時間にわた  
り1回、それぞれについて36ℓの同一組成の  
緩衝液に対して透析した。透析後のフィブリノ  
ゲン溶液の容量は1.53ℓであった。次にその溶  
液を8000×gで20分間遠心分離した。280nmで  
測定された溶液の光学密度は47であった。こ  
の溶液を他の接着剤成分を添加してある(下記  
参照)前記緩衝液で35~37の光学密度(280  
nm)となるように、すなわち約20g/ℓのヒ

する。

従って、接着剤は1個のシリンジを用いて液  
状で適用できるため、調製、操作および使用が  
簡素化する。この接着剤は生体に許容されるも  
のであり、また完全に吸収される。

ラット皮膚の刺し傷モデルにおける結合試験  
および豚の小腸吻合部の結合において認められ  
るように、この一成分接着剤は結合時間におい  
てあるいはひき裂き強度において二成分接着剤  
と異なる。凍結乾燥活性化化合物の溶解に用  
いられる溶液の至適カルシウムイオン濃度を選  
択することにより、結合強度を増大させること  
が可能でさえある。

次の実施例は、本発明を例示するためのもの  
である。

## 実施例 1

500mlの組織接着剤を製造するために、1  
モルあたり2g原子のカルシウムイオンを含み

ト・フィブリノゲンとなるように希釈した。

このための特定の手順は次のとおりであった  
: 透析を終えそして遠心分離されたヒト・フィ  
ブリノゲン溶液(1.53ℓ)を35~37℃で0.65  
および0.2μの孔径を有するフィルタを通して  
順次濾過した。生理食塩水1ℓあたり350U  
のFⅡを含む117.5mlの低温殺菌FⅡ濃縮物を  
0.2μの孔径のフィルタを通して濾過して上で  
得られた滅菌フィブリノゲン溶液に導入した。

次に515,000 KIU(カリクレイン阻害剤単位)  
のアプロチニン、5.13gのグルタミン酸ナトリ  
ウム、33.9mlのヒト・アルブミン溶液(20g/  
100mlを含有)、6.78gのイソロイシンおよび  
10,000Uの低温殺菌PPSB濃縮物(プロトロンビ  
ン因子濃縮物:FⅡに基づく活性単位)、100  
Uの(低温殺菌)ATⅢおよび3.1mlの0.1モル/ℓ  
CaCl<sub>2</sub>溶液を添加した。

次にその容量を透析緩衝液を用いて407.5

膜とした。この溶液を0.2 $\mu$ の孔径を有するフィルタを通して濾過して、FⅧ含有フィブリノゲン溶液に導入した。約2.055 $\mu$ 以下の組成を有するpH 7.5の溶液が得られた：

ヒトフィブリノゲン	2.0 g/100 $\mu$ l
ヒトアルブミン	0.33 g/100 $\mu$ l
アルギニン	0.3 g/100 $\mu$ l
グルタミン酸ナトリウム	2.5 g/l
イソロイシン	3.3 g/l
第Ⅷ因子	20,000 U/l
アプロチニン	250,000 KIU/l
プロトロンビン	5,000 U/l(FⅡとして計算)
抗トロンビン	50 U/l
NaCl	0.05 モル/l
クエン酸三ナトリウム	0.005 モル/l
塩化カルシウム	0.15 ミリモル/l

この凝固溶液を4 $\mu$ ずつパックしそして凍結乾燥した。無色で速溶性の凍結乾燥物が得られ

このための手順は次のとおりとした：

127 $\mu$ の緩衝液を容器に導入し、次いで溶液100 $\mu$ あたり20gのヒト・フィブリノゲンを含む8.2 $\mu$ のヒト・アルブミン溶液、125,000 KIUに達する6 $\mu$ のアプロチニンおよび2,500 Uの第Ⅱ因子と25 UのATⅢを含む50 $\mu$ のプロトロンビン濃縮物を添加した。1.65gのL-イソロイシンおよび1.25gのグルタミン酸ナトリウムをこれに溶解した後、10,000 UのFⅧを含む40 $\mu$ のFⅧ濃縮物を添加し、その混合物をホモジナイズしそしてその溶液のpHをpH 7.5に調整した。

次にこの溶液を前述のフィブリノゲン溶液および0.15 $\mu$ の0.1M CaCl<sub>2</sub>溶液と混合しホモジナイズし、そして35～37℃で孔径0.2 $\mu$ のフィルタを通して濾過することにより凝固した。約500 $\mu$ の実施例1と同様の組成の凝固溶液が得られた。この溶液を4 $\mu$ ずつパックし、そ

た。

組織接着剤として用いるために、1パック分を1 $\mu$ の溶媒にとった。

## 実施例 2

125 $\mu$ の組織接着剤を製造するために、欧州特許第0,103,196号に記載の方法により得られた100gの低温殺菌され高度に精製されたヒト・フィブリノゲン画分を112 $\mu$ の透析緩衝剤に溶解しそしてそれぞれ実施例1と同じ緩衝液10 $\mu$ に対して3回透析した。透析後の濃縮フィブリノゲン溶液の容量は269 $\mu$ であった。それを8,000 $\times$ gで20分間遠心分離した。280nmでの溶液の光学密度は69.2であった。その溶液を透析緩衝液の組成に相当する組成を有し、そして他のすべての接着剤成分が混合されている緩衝液で希釈してフィブリノゲンに基づく280nmでの光学密度を35～37とした。

して凍結乾燥した。無色の速溶性凍結乾燥物が得られた。

組織接着剤として用いるには、1パック分を1 $\mu$ の溶媒にとる。

特許出願人 ベーリンググヴェルケ・アクチエン  
ゲゼルシャフト

代理人 弁理士 高 木 千 郎  
外 2 名

